

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-49579

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)2月19日

C 12 N 5/06

8515-4B C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 培地

⑯ 特 願 平1-44393

⑰ 出 願 平1(1989)2月23日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)2月29日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-47054

㉑ 発 明 者 見 原 明 東京都町田市木曽町1079-22
 ㉒ 発 明 者 藤 吉 宜 男 東京都町田市旭町1-12-2
 ㉓ 発 明 者 坂 戸 邦 昭 神奈川県厚木市上荻野987-37
 ㉔ 発 明 者 古 川 忠 康 東京都町田市金井町2612-165
 ㉕ 発 明 者 山 根 續 宮城県仙台市八木山南6-6-20
 ㉖ 出 願 人 協和醸酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明 細 書

1. 発明の名称

培地

2. 特許請求の範囲

- (1) 小麦グルテン酵素分解物を含有する培地。
 (2) 小麦グルテン酵素分解物および酵母エキスを含有する培地。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は小麦グルテン酵素分解物を含有する培地に関する。本培地は動物細胞培地用培地として有用である。

従来の技術

従来、動物細胞用培地として、アミノ酸類、ビタミン類、糖類、無機塩等を含有する培地(例えば、RPMI 1640培地、イーグルのMEM培地など)が知られている。しかしながら、これら培地を蒸気滅菌すると、培地中のグルタミンが分解してしまい、グルタミンとして利用されない欠

点がある。これを改良するものとして、加熱に対して安定であり、かつ動物細胞にL-グルタミンとして利用されるL-グルタミン誘導体(L-アミノ酸-L-グルタミン)を含有する培地が知られている(特開昭61-271985号公報)。

発明が解決しようとする課題

培地を作成する際に、前記L-グルタミン誘導体以外に培地成分として、培地に多種類のアミノ酸を加える必要がある。

蒸気滅菌が可能でグルタミンの培地への別添加は必要がなく、かつ添加するアミノ酸の数を減少させた安価な動物細胞培養用培地が求められる。

課題を解決するための手段

本発明は小麦グルテン酵素分解物を含有する培地および該培地に酵母エキスを添加した培地を提供する。

本発明の培地は動物細胞の培養に用いられる培地の構成成分として、少なくとも小麦グルテン酵素分解物が含まれていればいずれの培地でもよい。例えば、糖類、ビタミン類および無機物を含む培

地に小麦グルテン酵素分解物を添加した培地又は糖類および無機物に小麦グルテン酵素分解物および酵母エキスを添加した培地である。さらに、通常の動物細胞培養に用いられる基礎培地に①小麦グルテン酵素分解物又は②該分解物および酵母エキスを添加した培地も本発明の培地としてあげられる。さらに、本発明の培地にアミノ酸類、抗生物質、その他動物細胞を生育させる物質などを添加してもよい。

本発明の培地の糖類としては、グルコース、ガラクトース、フルクトースなどがあげられる。ビタミン類としては、ビオチン、葉酸、 ρ -アミノ安息香酸、ニコチンアミド、パントテン酸カルシウム、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、シアノコバラミン、塩化コリン、イノシトール、アスコルビン酸、チミジンなどがあげられる。

無機物としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、硫酸マグネシウム、硝酸カルシウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、亜セレン酸な

どがあげられる。

アミノ酸類としては、システイン、アルギニン、トリプトファンなどがあげられる。

抗生物質としては、ペニシリン、ストレプトマイシン、カナマイシンなどがあげられる。

動物細胞を生育させる物質としては牛胎児血清、仔牛血清、馬血清などの動物血清、豚肝臓抽出液、植物などの動物臓器抽出物、インスリン、トランスフェリン、コレステロールなどのホルモン類などがあげられる。基礎培地としては、一般の動物細胞の培養に用いられるものであればいずれでもよい。例えば、RPMI 1640 培地、イーグルのMEM 培地、ハムのF12、ダルベッコ変法イーグル培地、199 培地などがあげられる。

本発明の培地に添加される小麦グルテン酵素分解物としては、小麦グルテンを蛋白質分解酵素で分解したものであればいずれも用いられる。例えば、市販の小麦グルテン酵素分解物、後記方法によって得られる小麦グルテン酵素分解物等が用いられる。好ましくは、第1図に示すゲル透過高性

3

能液体クロマトグラフィーによる分子量分布を有し、かつ後記第1表に示すアミノ酸組成を有する小麦グルテン酵素分解物、さらに好ましくは、第2図に示すゲル透過高性能液体クロマトグラフィーによる分子量分布を有するものが用いられる。

ゲル透過高性能液体クロマトグラフィーの測定条件

使用機器 : 島津製作所製 LC-6A
カラム : TSK Gel G3000SW XL
溶媒 : 0.5M食塩/40mM リン酸バッファー (pH8)
流速 : 1ml/min
紫外線吸収 : 280nm
分子量マーカー (第1図)

溶出位置 (分)	分子量
8.497	67,000
9.177	43,000
10.59	25,000
10.667	13,700

5

4

分子量マーカー (第2図)

溶出位置 (分)	分子量
10.667	13,700

培地に添加される小麦グルテン酵素分解物の量としては、培地1ℓ当り0.1-10g、好ましくは0.25-3g (乾物換算) の範囲である。

培地に添加される酵母エキスとしては、一般に市販品が用いられ、添加量としては、培地1ℓ当り0.1-2g、好ましくは0.25-1g (乾物換算) の範囲である。

小麦グルテン分解物は市販品以外に下記の方法で得られたものも使用できる。

小麦グルテンを酵素で処理して小麦グルテン酵素分解物を得ることができる。

使用する酵素としては、動物由来の酵素 (トリプシン、ペプシンなど)、植物由来の酵素 (プロメラン、パパインなど)、カビ由来の酵素 (アルカリ性プロテアーゼなど)、細菌由来の酵素 (酸性プロテアーゼなど) などがあげられる。その使用量は、反応pH、反応温度、反応時間などにもよ

6

るが、通常50-50万単位/小麦グルテン100gの範囲が好ましい。反応は各酵素の至適条件下で行えばよいが、通常10-70℃で1-24時間行われる。

つぎに、本発明に用いる小麦グルテン酵素分解物のアミノ酸組成の一例を第1表に示す。

第 1 表

アミノ酸	小麦グルテン酵素分解物 (mg/g)
アスパラギン酸	29.7
トレオニン	24.9
セリン	47.1
グルタミン酸	362.3
プロリン	121.8
グリシン	33.9
アラニン	25.5
システイン	16.2
バリン	34.7
メチオニン	15.6
イソロイシン	28.2
ロイシン	61.4
チロシン	29.8
フェニルアラニン	48.5
ヒスチジン	25.3
リジン	16.5
アルギニン	34.2
トリプトファン	5.8

(注) 1.NH₂。遊離より推定してアスパラギン酸およびグルタミン酸の80-90%はア

7

二水素カリウム(無水)60mg/l、硫酸マグネシウム(無水)48.8mg/l、塩化マグネシウム46.8mg/l、塩化カルシウム(無水)140mg/l及びフェノールレッド6mg/l、小麦グルテン酵素分解物(植物性蛋白SK-5、千葉製粉製)0.5g/l(pH1, 2, 4, 6, 8及び10で蒸気滅菌)、酵母エキス0.5g/l、システイン塩酸塩一水塩60mg/l、トリプトファン10mg/l、アルギニン塩酸塩200mg/l、ペニシリン50,000U/l、ストレプトマイシン50mg/l、HEPES(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-2-エタンスルホン酸、グッドの緩衝液用試薬)10mM、インシュリン3mg/l、トランスフェリン5mg/l、ビルビン酸5mM、亜セレン酸0.125μMおよびガラクトース1g/l、炭酸水素ナトリウムでpHを7.4に調節。

スバラギンおよびグルタミン由来と考えられる。

2.分析方法:小麦グルテン酵素分解物を塩酸により加水分解した後、アミノ酸アナライザー(日立8500)で分析した。

小麦グルテン酵素分析物の蒸気滅菌(120℃、15分間)時のpH安定性について、ナマルバ細胞の増殖性を基に検討した実験例を以下に示す。

実験例1

ナマルバ細胞を 2.0×10^5 cells/mlになる様に下記組成の培地に懸濁させた懸濁液各2mlを24穴マイクロプレート(メンク社製)の各穴に添加した後、5%CO₂-95%空気存在下、37℃で2日間培養した。培養後の細胞数を第2表に示す。

培地組成

ハントス液[グルコース1g/l、塩化ナトリウム8g/l、塩化カリウム0.4g/l、リン酸一水素ナトリウム(無水)47.9mg/l、リン酸

8

第 2 表

小麦グルテン酵素分解物の蒸気滅菌時のpH	細胞数 ($\times 10^4$ cells/ml)
1	13
2	36
4	37.5
6	36.5
8	37
10	22.5

表から明らかな如く、小麦グルテン酵素分解物はpH2-8において蒸気滅菌されても、該分解物中のグルタミンがほとんど分解されることなく、培地成分として、安定して使用されることが判る。

次に小麦グルテン酵素分解物と酵母エキスとの混合によるナマルバ細胞の増殖性についての実験例を示す。

実験例2.

実験例1において、ナマルバ細胞の濃度 2.0×10^5 cells/mlを 4.2×10^5 cells/mlに、培地組成の小麦グルテン酵素分解物(植物性蛋白SK

—5、干菜製粉陶製) 0.5 g/ℓを参考例1で得られた小麦グルテン酵素分解物(濃度: 0, 0.5, 1, 2.5, 5及び10 g/ℓ)に代える以外は実験例1と同様に培養した。培養後の細胞数を第3表に示す。

第 3 表

参考例1で得られた小麦グルテン酵素分解物の濃度 (g/ℓ)	細胞数 ($\times 10^3$ cells/ml)
0	1.7
0.5	5.7
1	5.6
2.5	7.2
5	4.9
10	4.75

実験例3

実験例1において用いた培地中の小麦グルテン酵素分解物及び酵母エキスの使用量を第3表に示す使用量に変える以外は実験例1と同様に培養した。

11

培養後の細胞数を第5表に示す。

第 5 表

追加添加物の種類	濃度	細胞数 ($\times 10^3$ cells/ml)
リバーコンセントレート 202-3	0.25 g/ℓ	6.93
コレステロール	0.1 mg/ℓ	8.5
コレステロール	1.0 mg/ℓ	5.9
イノシトール	10 mg/ℓ	6.5
対 照 (参考例1で得られた小麦グルテン酵素分解物+酵母エキス)		5.23

本発明の培地はナマルバ細胞、ヒト胃癌由来 KATO-III細胞、ヒト子宮頸癌由来 HeLa細胞、ヒト羊膜由来 FL細胞、ヒト白血病由来 HL-60細胞、アフリカミドリザル腎由来 Vero細胞、マウス繊維芽細胞 L929細胞などの培養に用いることができる。

以下に実施例を示す。

培養後の細胞数を第4表に示す。

第 4 表

		酵母エキスの使用量 (g/ℓ)	
		0.5	1
小麦グルテン	0.25	84.5	61.5
酵素分解物の使用量 (g/ℓ)	0.5	89.0	69.5
	1	78.0	72.5

細胞数: $\times 10^4$ cells/ml

実験例4

実験例1において、ナマルバ細胞の濃度 2.0×10^3 cells/ml を 3.0×10^3 cells/ml に、培養日数2日間を3日間に、及び小麦グルテン酵素分解物(植物性蛋白 SK-5、干菜製粉陶製) 0.5 g/ℓを参考例1で得られた小麦グルテン酵素分解物 0.5 g/ℓに代えて、さらに培地にリバーコンセントレート 202-3 (豚肝臓抽出濃縮物: シグマ社製) 0.25 g/ℓ、コレステロール 0.1 mg/ℓもしくは1.0 mg/ℓ又はイノシトール 10 mg/ℓを添加する以外は実験例1と同様に培養した。

12

実施例1

ナマルバ細胞を 5×10^3 cells/ml になる様に下記組成の培地に懸濁させた懸濁液各 2 ml を 24 穴マイクロプレート (メンク社製) の各穴に添加した後、5% CO₂-95% 空気存在下、37℃で2日間培養した。培養後の細胞数は 7.0×10^4 cells/ml であった。

培 地 組 成

ハanks液、植物性蛋白 SK-5 0.5 g/ℓ、システイン塩酸塩-水塩 60 mg/ℓ、トリプトファン 10 mg/ℓ、アルギニン塩酸塩 200 mg/ℓ、ペニシリン 50,000 U/ℓ、ストレプトマイシン 50 mg/ℓ、HEPES 10 mM、インシュリン 3 mg/ℓ、トランスフェリン 5 mg/ℓ、ビルビン酸 5 mM、亜セレン酸 0.125 μM、ガラクトース 1 g/ℓ及び RPMI 1640 培地のビタミン混合物、pH 7.4

実施例2

ナマルバ細胞を 5.0×10^3 cells/ml になる様に下記組成の培地に懸濁させた懸濁液 2.5 ml を F

13

14

7.5 ml 培養フラスコ (コーニング社製) に添加した後、37℃で3日間培養したところ、細胞数が 1.07×10^4 cells/ml に増殖した。ついで、細胞数を再び 5.0×10^3 cells/ml に下げた後、同様に培養したところ、細胞数が 1.05×10^4 cells/ml まで増殖した。

培地組成

ハンクス液、植物性蛋白 SK-5 0.5 g/l、酵母エキス 0.5 g/l、HEPES 10 mM、インシュリン 3 mg/l、トランスフェリン 5 mg/l、ビルビン酸 5 mM、亜セレン酸 0.125 mM 及びガラクトース 1 g/l、pH 7.4

実施例 3

ヒト胃がん由来 KATO III 細胞を 2.5×10^4 cells/ml になる様に実施例 2 で用いた培地に牛胎児血清 40 g/l を添加した培地で懸濁した懸濁液 10 ml を F25 ml 培地フラスコ (コーニング社製) に添加した後、37℃で53日間継代培養を行った。各培養日数の日にそれぞれ細胞数を測定した後、再度細胞数を 1.0×10^4 cells/ml に

下げ培養を続けた。その結果を第 6 表に示す。

第 6 表

培養日数 (日)	細胞数 ($\times 10^4$ cells/ml)
0	1.4
4	4.8
10	3.3
17	39.4
27	7.3
34	75.5
41	79.5
44	47.5
46	66.5
53	5.6

実施例 4

ナマルバ細胞を 4.2×10^3 cells/ml になる様に下記組成の培地 5 ml に懸濁させた後、F25 ml 培養フラスコ (コーニング社製) に添加し、37℃で第 7 表に示す如く継代培養を行った。その結果を第 7 表に示す。

15

培地組成

塩化ナトリウム 6.8 g/l、塩化カリウム 0.4 g/l、リン酸二水素ナトリウム 108.7 mg/l、硫酸マグネシウム 97.7 mg/l、塩化カルシウム 0.2 g/l、グルコース 1 g/l、フェノールレッド 6 mg/l、トリプトファン 10 mg/l、アルギニン塩酸塩 0.2 g/l、システイン塩酸塩-水塩 60 mg/l、参考例 1 で得られた小麦グルテン加水分解 2.5 g/l、酵母エキス 0.5 g/l、リバーコンセントレート 202-3 0.25 g/l、コレステロール 0.1 mg/l、炭酸水素ナトリウム 1.5 g/l、ペニシリン 50,000 U/l、ストレプトマイシン 50,000 µg/l、HEPES 2383 g/l、インシュリン 3 mg/l、トランスフェリン 5 mg/l、ビルビン酸ナトリウム 550.2 mg/l、亜セレン酸 16.13 µg/l、ガラクトース 1 g/l、pH 7.4

16

第 7 表

培養日数 (日)	初期細胞数 ($\times 10^3$ cells/ml)	培養後の細胞数 ($\times 10^3$ cells/ml)
4 (0→4)	4.2	8.3
2 (4→6)	4.5	8.5
3 (6→9)	3.7	10.0
3 (9→12)	4.1	11.3
3 (12→15)	3.4	8.2
3 (15→18)	5.9	14.8
3 (18→21)	3.3	8.7

実施例 5

ハンクス液 (グルコース 1 g/l、塩化ナトリウム 8 g/l、塩化カリウム 0.4 g/l、リン酸二水素ナトリウム (無水) 47.9 mg/l、リン酸二水素カリウム (無水) 60 mg/l、硫酸マグネシウム (無水) 48.8 mg/l、塩化マグネシウム 46.8 mg/l、塩化カルシウム (無水) 140 mg/l 及びフェノールレッド 6 mg/l) に植物性蛋白 SK-5 0.5 g/l、システイン塩酸塩-水

17

18

塩 60 mg/ℓ、トリプトファン 10 mg/ℓ、アルギニン塩酸塩 0.2 g/ℓ、ペニシリン 50,000 U/ℓ、ストレプトマイシン 50 mg/ℓ、HBFGS 10 mM、インシュリン 3 mg/ℓ、トランスフェリン 5 mg/ℓ、ビルビン酸 5 mM、亜セレン酸 0.125 μM、ガラクトース 1 g/ℓ 及び RPMI 1640 培地のビタミン混合物を添加し培地を得た。

実施例 6

実施例 5 において、RPMI 1640 培地のビタミン混合物の代わりに酵母エキス 0.5 g/ℓ を用いる以外は実施例 5 と同様にして培地を得た。

参考例 1

小麦グルテンを 5 W/V % になる様に水溶液に懸濁した後、塩酸で pH を 4 に調整した。該懸濁液にスミチーム RP (酸性プロテアーゼ：新日本化学社製) をグルテン当り 1 W/V % 加え、50℃ で 2 時間振盪した後、カセイソーダで pH を 7 に調整した。これにスミチーム MP (アルカリ性プロテアーゼ：新日本化学社製) をグルテン当り 1 W/V % 加え、50℃ で 2 時間振盪後、遠心分

離 (3000 r.p.m.、10 分) し、上清を小麦グルテン酵素分解物 (グルテン濃度 5 W/V %) として得た。

発明の効果

本発明の培地はグルタミンがペプチドの形で存在する為、蒸気滅菌してもグルタミンが分解されることがなくグルタミンを別途添加する必要はない。又、小麦グルテン酵素分解物中には多種類のアミノ酸が含まれているため、別途添加するアミノ酸の種類も少なくなり、経済的にも安価な培地となる。

4. 図面の簡単な説明

第 1 及び 2 図は本発明の培地に添加される小麦グルテン酵素分解物のゲル透過高性能液体クロマトグラフィーによる分子量分布パターンの一例を示す。

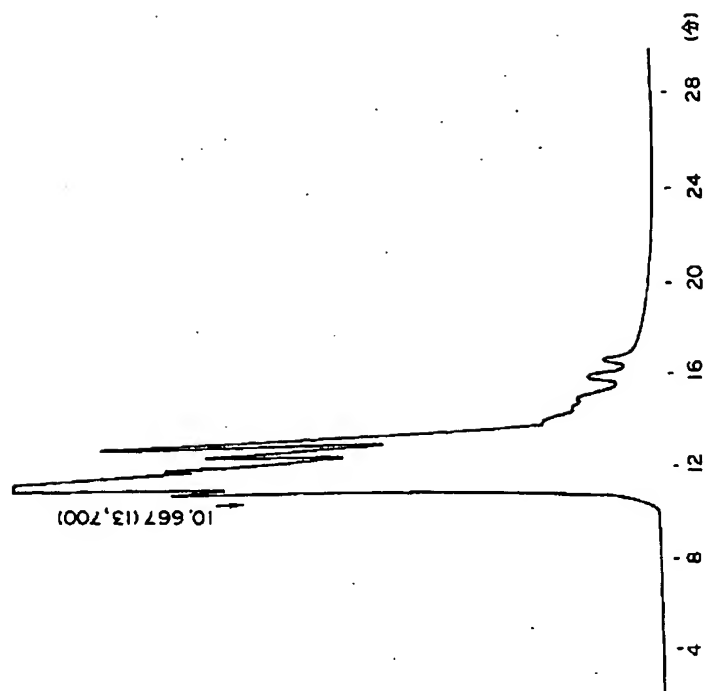
但し、数値は溶出時間 (分)、カッコ内の数値は分子量を示す。

特許出願人 (102) 協和 醗 酵 工 業 株 式 有 限 公 司

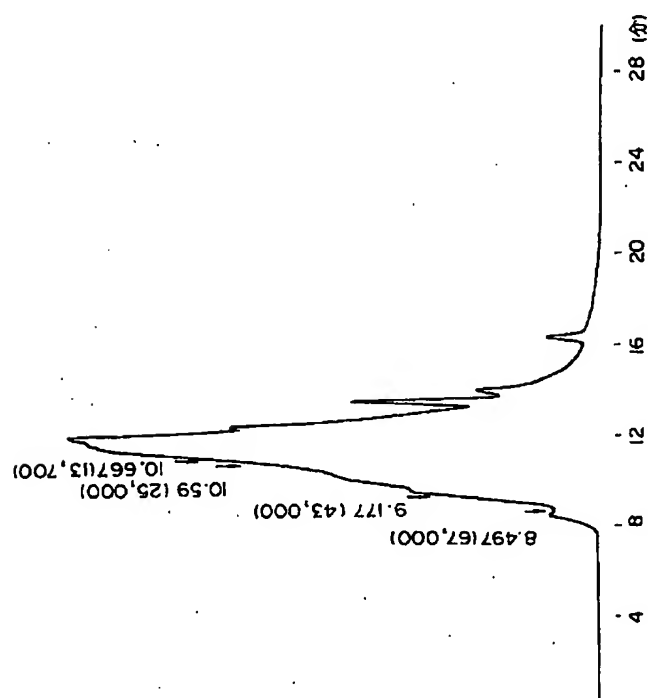
代表者 加 藤 幹 夫



第 2 図



第 1 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☒ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.